

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGIA



Estudio del efecto biocida de un nuevo material inorgánico sobre la formación de un biofilm oral *in vitro*

Tutor: Profesor Doctor Mariano Sanz

Honorato Vidal

Madrid, 2014

Índice

Resumen	5
1. Introducción	7
1.1 Biofilms.....	7
1.2 Implantes.....	13
1.3 Superficies biocidas	15
2. Objetivos e Hipótesis	19
2.1 Objetivos Específicos	19
2.2 Hipótesis:	19
3. Material y Métodos	21
3.1 Materiales utilizados en el estudio	21
3.2 Bacterias y medios de cultivo empleados	22
3.3 Elaboración del inoculo con las seis cepas bacterianas seleccionadas y formación del biofilm en las superficies de los discos	24
3.4 Extracción del biofilm de los discos y recuento bacteriano por cultivo	26
3.5 Visualización del biofilm mediante Microscopia Laser Confocal (CLSM)	27

3.6 Análisis Estadístico	28
4. Resultados.....	31
4.1 Descripción de las imágenes obtenidas por CLSM	31
4.1.1 Tiempo de estudio 24h	32
4.1.2 Tiempo de estudio 48h	32
4.1.3 Tiempo de estudio 72h	33
4.2 Análisis cuantitativo de las bacterias viables mediante recuento por cultivo	34
4.2.1 Tiempo de estudio 24h	35
4.2.2 Tiempo de estudio 48h	37
4.2.3 Tiempo de estudio 72h	40
4.2.4 Análisis de la evolución bacteriana en cada material de estudio	42
5. Discusión	45
6. Conclusión	49
7. Agradecimientos	51
8. Bibliografía.....	53

Resumen

Introducción y objetivos: Las enfermedades periodontales tienen una naturaleza inflamatoria e infecciosa. Las bacterias presentes en estas patologías presentan fenotipos distintos de acuerdo con su organización planctónica o en biofilm. El biofilm se forma gracias a la adhesión y a la co-agregación entre microorganismos sobre una superficie. El uso de implantes dentales es una práctica odontológica muy difundida al día de hoy. Una posible línea de investigación para la prevención de las enfermedades peri-implantarias sería el estudio de nuevos materiales que fueran capaces de inhibir la formación y el crecimiento del biofilm bacteriano.

El objetivo de este trabajo fue comprobar el efecto biocida del recubrimiento de Ecovidrio G3 sobre un modelo de biofilm subgingival *in vitro* de seis bacterias.

Material y métodos: Las cepas bacterianas seleccionadas, *Streptococcus oralis* (So), *Actinomyces naeslundii* (An), *Veillonella parvula* (Vp), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) y *Porphyromona gingivalis* (Pg), se pusieron sobre la superficie de los discos de un material compuesto cerámico-cerámico nanocomposite Z10Ce recubierto Ecovidrio G3 (A1) (con efecto biocida) y de los discos control de hidroxiapatita (HA). Se depositaron en una placa de cultivo celular tres discos de cada material, y se cubrieron con 1.5 mL de inóculo con las cepas bacterias seleccionadas. Las placas se incubaron en condiciones de anaerobiosis durante 24, 48 y 72 horas, a 37°C. Los recuentos bacterianos se realizaron en placas de Agar Sangre suplementado y medio Dentaid-1. El biofilm se analizó mediante microscopía Láser Confocal (CLSM) para observar su estructura tridimensional y la viabilidad bacteriana. La comparación de cada bacteria en ambos discos en cada tiempo de estudio se realizó mediante comparación de medias (t de student). Para el estudio de la evolución en el tiempo de cada especie en ambos discos se realizó el análisis de la variancia (ANOVA).

Resultados: En este trabajo se encontraron algunas diferencias estadísticamente significativas en los recuentos bacterianos. El número de unidades formadoras de colonias (UFC)/mL de *F. nucleatum* en el material A1 en el tiempo de incubación de 24h, y de *A. actinomycetemcomitans* en el material A1 en el tiempo de incubación de 48h, han sido menores que en HA siendo la diferencia estadísticamente significativa. Mediante Microscopia Láser Confocal (CLSM) se observaron diferencias estructurales en el desarrollo del biofilm en el material A1 en comparación con el control.

Conclusiones: Este estudio demuestra que el recubrimiento con Ecovidrio G3, altera el desarrollo del biofilm bacteriano. Los cambios estructurales son visibles por Microscopia Laser Confocal observándose también diferencias significativas en algunos de los recuentos bacterianos. Son resultados preliminares, y se necesita aumentar el número de experimentos para confirmar estos resultados.

1. Introducción

1.1 Biofilms

Las enfermedades periodontales tienen una naturaleza inflamatoria e infecciosa (Loe, Theilade et al. 1965, Lindhe, Hamp et al. 1975, Lindhe and Rylander 1975) (Loe, 1965: Lindhe et al., 1975). Hoy en día la evidencia científica nos indica que cepas bacterianas específicas, presentes en complejos determinados y con una precisa sucesión, son necesarias para la iniciación de la enfermedad (Socransky, Haffajee et al. 1998). Sin embargo, aunque la presencia de las bacterias es indispensable para el comienzo de la periodontitis, varios factores influyen en su patogenia (Figura 1). Entre ellos encontramos factores ambientales o hábitos, como el tabaquismo, enfermedades sistémicas, que afectan los procesos inmunológicos del huésped, y también factores genéticos.

Las bacterias pueden estar en forma planctónica u organizadas en biofilms. Las mismas bacterias, con el mismo genoma pueden presentar fenotipos distintos de acuerdo con su organización planctónica o en biofilm. Así como en los dientes, los implantes son superficies que al contrario de los tejidos blandos, no sufren descamación, así que son ideales para la colonización bacteriana y la formación de biofilms. Estos biofilms son normalmente constituidos por varios tipos bacterianos siendo esta característica llamada de “heterogeneidad fisiológica”.

Los biofilms son estructuras tridimensionales compuestas por agregados de diferentes comunidades bacterianas así como una matriz de exopolisacáridos, también llamado de *glicocalix*. Este es el principal constituyente del biofilm bacteriano siendo muy útil tanto al nivel estructural actuando como un “*scaffold*” como para funcionar como una reserva de nutrientes. Algunas de las bacterias presentes en el biofilm son las principales productoras del *glycocalix*.(Socransky and Haffajee 2002)

La estructura del biofilm con setas, canalículos, permite que en gran proximidad pueden existir condiciones ambientales muy distintas (pH, temperatura, potencial REDOX así como concentraciones de nutrientes y metabolitos). Los canalículos posibilitan el paso de nutrientes, metabolitos y otras sustancias entre las varias porciones del biofilm. Los biofilms, se caracterizan por tener un gradiente negativo de nutrientes y potencial REDOX de acuerdo con la distancia a la superficie del biofilm. Así, según se va profundizando, habrá menos nutrientes y menos oxígeno. La heterogeneidad fisiológica está condicionada de acuerdo con estas características ambientales así que en la superficie del biofilm hay más bacterias aerobias o aerobias facultativas y en porciones del biofilm más alejadas de la superficie se encuentran más bacterias gram negativas anaerobias. Así, el biofilm ofrece grandes ventajas a las bacterias de que está compuesto en comparación a las mismas en estado planctónico.(Marsh 2005)

El biofilm se forma gracias a la adhesión y a la co-agregación entre microorganismos sobre una superficie. Determinadas especies tienen la

capacidad de co-agregarse entre si de forma especifica siendo posible observarse un patrón de incorporación constante en el biofilm.

Las fases de crecimiento y maduración del biofilm han sido estudiadas por Theilade y Theilade en 1985.(Theilade and Theilade 1985)

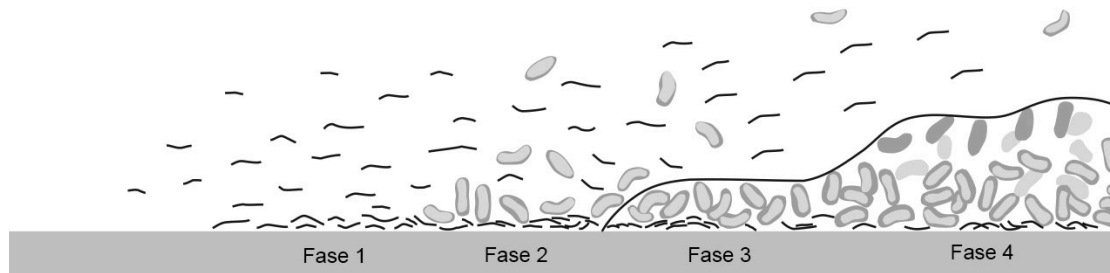


Figura 1 - Las cuatro fases del desarrollo del biofilm - Adaptado de Marshal 1992

La primera fase de formación del biofilm se caracteriza por la agregación de glicoproteínas, las mucinas, y de moléculas hidrófobas salivares. Estas forman la película adquirida que es esencial para la posterior formación y desarrollo del biofilm. Posteriormente, en la segunda fase, microorganismos aislados con estructuras específicas capaces de ligarse a los componentes de la película adherida, consiguen unirse a esta. Estos microorganismo son los colonizadores iniciales y forman parte de este grupo los *Streptococos* gram positivos anaerobios facultativos. Mientras nuevas otras bacterias, denominadas *Actynomices* pueden unirse también directamente a la película adherida o co-agregarse a las bacterias ya adheridas. En una tercera fase, ocurre la multiplicación celular de las bacterias adheridas y se empieza a producir la matriz del biofilm. En la cuarta fase va ocurriendo la adsorción secuencial de nuevos colonizadores. En esta

fase es de destacar la presencia de las especies “puente”, siendo una de las mas representativas el *Fusobacterium nucleatum*. Estas bacterias proporcionan las estructuras necesarias para la co-agregacion de los colonizadores tardíos. La conexión entre las varias bacterias es de origen especifica y ha sido estudiada por Socransky (1998). (Socransky, Haffajee et al. 1998)

Las interacciones bacterianas fueron estudiadas también según las uniones específicas adhesina-receptor (Kolenbrander, Andersen et al. 2002). Este estudio confirma los resultados del modelo de Socransky (1998). (Socransky, Haffajee et al. 1998)

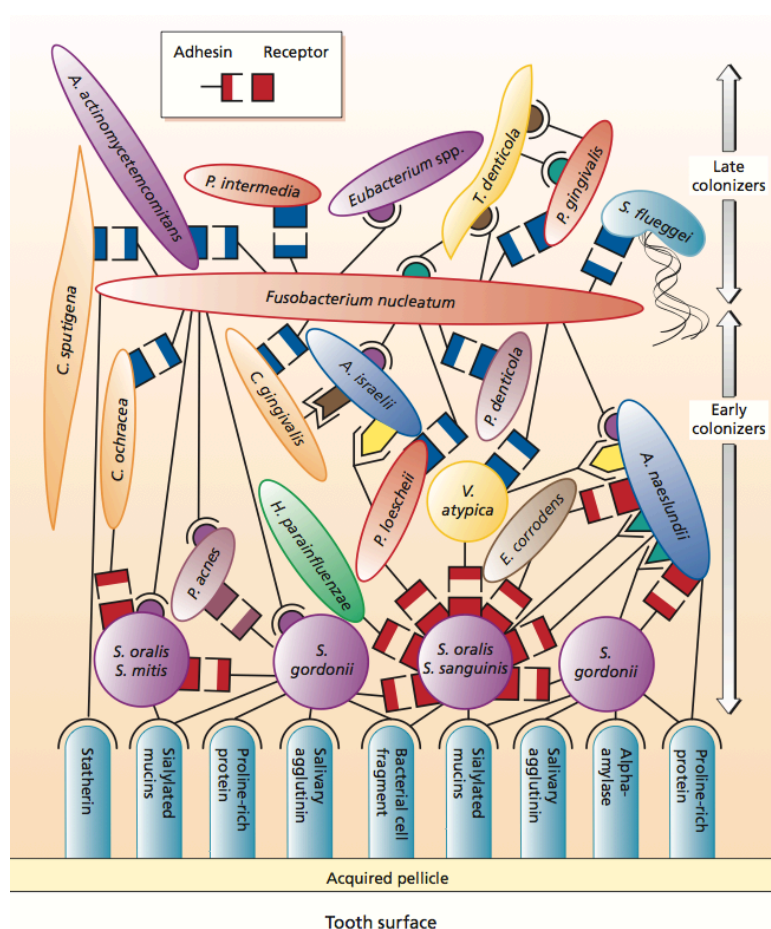


Figura 2 - Relación espacio temporal de la colonización bacteriana. Adaptado de Kolenbrander et al. 2002 (Kolenbrander, Andersen et al. 2002)

Las distintas comunidades bacterianas presentes en el biofilm tienen la capacidad de comunicación entre ellas. Así que el fenotipo e comportamiento bacteriano cambia en función de las moléculas señalizadores presentes. Por ejemplo, cuando el biofilm está en una fase madura y ya no hay más condiciones para la llegada y/o multiplicación bacteriana, las moléculas señalizadoras presentadas son distintas, de forma de disminuir el ritmo de división celular. A este proceso se llama *Quorum Sensing*.

Por otro lado, las diferentes especies presentes en el biofilm, además de tener mecanismos de comunicación, tienen cierta capacidad de transmitir material genético. En este campo es notorio la capacidad de pasaje de genes responsables por la resistencia a antibióticos.

La estructura del biofilm con grande cantidad de exopolisacárido en su constitución, actúa también como agente de protección para el biofilm porque dificulta la fagocitosis de las bacterias así como disminuye la perfusión de sustancias como antibióticos.

Existen también diversos sinergismos entre bacterias en que determinadas sustancias producidas por unas puede servir de sustrato para otras así como determinadas moléculas producidas para la defensa de antibióticos, no solo actúan para la defensa de las bacterias capaces de las producirlas como de las bacterias que están a su alrededor.

De la misma forma que existen sinergismos existen también relaciones de antagonismo que el desarrollo de determinadas bacterias inhibe el de otras. Esto puede acontecer por competición por la consumición de

determinado sustrato o por que determinadas bacterias producirán metabolitos capaces de dañar otras bacterias. (Socransky and Haffajee 2002)

El intercambio de material genético, la disminución de la perfusión de sustancias como los antibióticos, la disminución de la división y del fenotipo celular mediada la señalización inter bacteriana, hace con que las bacterias presentes en los biofilms sean muchísimas veces mas resistentes a antibióticos que las mismas especies en estado planctónico.

Según la secuencia de adsorción de las diferentes bacterias presentes en el biofilm típico de zonas subgingivales, Socransky ha establecido los clústeres bacterianos. Estos clúster están representados en la figura 3. Los complejos mas a la izquierda serian los mas cercas de la superficie dentaria mientras a la derecha estaría los mas cercanos de la línea epitelial. (Socransky and Haffajee 2002)

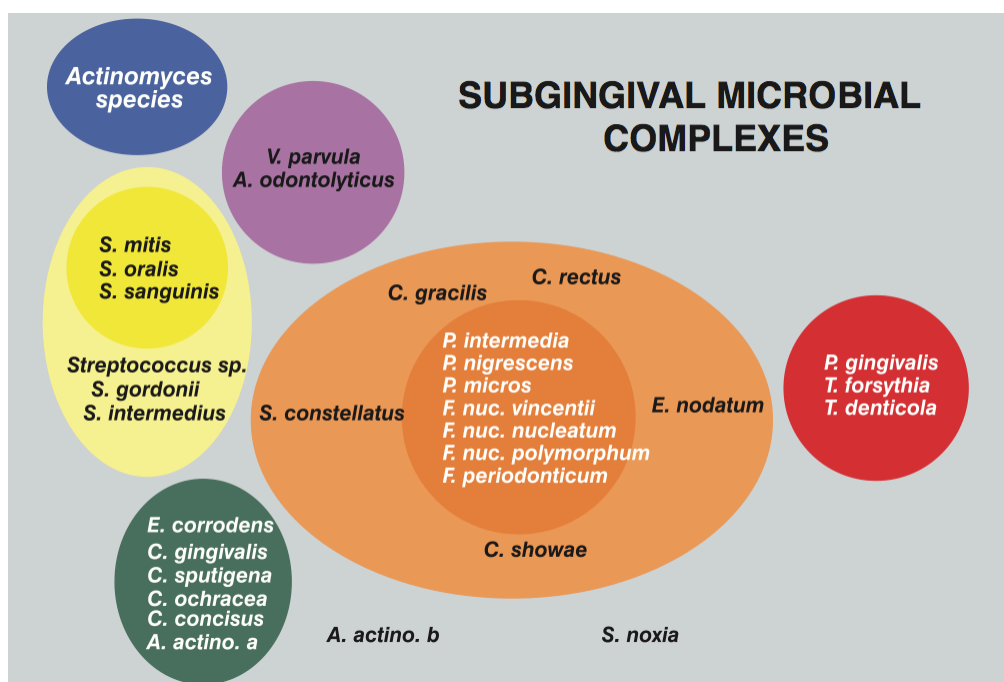


Figura 3 - Diagrama de asociación de las especies bacterianas subgingivales, adaptado de Socransky et al 1998 (Socransky, Haffajee et al. 1998)

1.2 Implantes

El uso de implantes dentales es una práctica odontológica muy difundida al día de hoy. Los implantes sirven para soportar restauraciones de forma de sustituir dientes ausentes en pacientes parcialmente o totalmente edéntulos. Estos dispositivos han ampliado mucho las posibilidades de tratamiento en estos tipos de pacientes en odontología, pero no están libres de problemas. En 1994, Albrektson y Isidor describen las patologías peri-implantarias que comprenden la mucositis y la peri-implantitis: La mucositis se define como una lesión reversible caracterizada por presencia de inflamación en la mucosa circundante a un implante osteointegrado, pero todavía sin pérdida del hueso de soporte; La peri-implantitis es caracterizada porque además de la inflamación, hay pérdida de hueso de soporte. La mucositis tiene un carácter reversible mientras la peri-implantitis es irreversible. (Albrektsson 1994)

En la revisión sistemática de Zitzmann y Berglundh (2008) (Zitzmann and Berglundh 2008) y en los datos provenientes del Sexto Taller Europeo de Periodoncia (Lindhe, Meyle et al. 2008) se puede observar que la prevalencia de patologías peri-implantares es similar a las enfermedades periodontales. La mucositis esta presente en 80% de los pacientes portadores de implantes dentales y en 50% de los implantes en estos pacientes. A su vez, la peri-implantitis esta presente entre 28 y 56% de los pacientes y entre el 12% y el 43% de los implantes.

Así, en los últimos años ha aumentado el interés por las patologías peri-implantarias, por ello es necesario que se realicen investigaciones para desarrollar nuevas formas de tratamiento y de prevención.

Se postula entonces, que las enfermedades peri-implantarias también estén relacionadas con la presencia de bacterias agregadas en biofilms orales. Estas pueden estar tanto en la superficie implantar como en los tejidos blandos peri-implantarios. (Lang, Berglundh et al. 2011) Así, como en la periodontitis, la prevención de la peri-implantitis ha sido basada en el control de la formación de biofilm en sus estructuras. Pero cuando ya esta establecida la periodontitis, el tratamiento no quirúrgico ofrece mejoras al nivel clínico y microbiológico muy limitadas. Así, los enfoques quirúrgicos resectivos y procedimientos regenerativos son necesarios para intentar parar la evolución o disminuir lesiones peri-implantarias. (Schwarz, Sahm et al. 2011)

En 1994, Pontoriero (Pontoriero, Nyman et al. 1992), basándose en el modelo de Berglundh y Lindhe (1992) (Berglundh, Lindhe et al. 1992) inducirán gingivitis y peri-implantitis experimental en un estudio en animales. El análisis por microscopia de contraste de fase, reveló proporciones similares de Cocos Gram+, bastoncillos y espiroquetas tanto en dientes como en implantes, al tiempo basal y a las tres semanas. Mombelli y Décaillet (2011) describirán que en un numero limitado de casos, la flora presente en la peri implantitis podría incorporar microflora típica de sistemas médicos implantados. (Mombelli and Decaillet 2011)

Fue demostrados también que la superficie de los implantes puede condicionar la manifestación y progresión de las enfermedades peri-implantarias (Albouy et al 2008).(Albouy, Abrahamsson et al. 2008) En los últimos años las superficies de implantes han sufrido una grande evolución con el objetivo de facilitar la osteointegración, siendo que el Titanio (Ti) con superficie moderadamente rugosa es el mas usado.

La rugosidad, composición, hidrofobicidad de la superficie implantar condiciona la colonización bacteria y la formación del biofilm (Wennerberg y Albrektsson 2010)., así que una posible línea de investigación para la prevención de las enfermedades peri-implantarias seria el estudio de nuevos materiales que fueran capaces de inhibir la formación y el crecimiento del biofilm bacteriano de forma que se evite el fracaso de los implantes, y que además, fueran compatibles con la osteointegración. (Wennerberg and Albrektsson 2010)

1.3 Superficies biocidas

El único modo de entender los sinergismos y el desarrollo de las bacterias que colonizan las superficies orales en biofilms es estudiándolas, no como cepas individuales sino en comunidad. Como ha sido dicho antes, la expresión del genoma bacteriano depende de factores ambientales como moléculas señalizadores de otras bacterias que condicionan así su fenotipo y su comportamiento en el biofilm. Por ello, es fundamental que el modelo de biofilm *in vitro* reproduzca el habitat natural de los biofilms, incluyendo las condiciones de superficie, así como las características específicas de accesibilidad de nutrientes, medio-ambiente físico-químico, pH, entre otros.

Así, en este estudio ha sido utilizado un protocolo de referencia para biofilms subgingivales, que es el elaborado por Sánchez et al (2011). En este modelo se utilizan colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempéranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*Fusobacterium nucleatum*) y tardíos (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*). En este protocolo se utilizan discos de hidroxiapatita como modelo y son utilizadas varias técnicas de microscopia, cultivo y moleculares que determinaran que el patrón de colonización y maduración en estos discos *in vitro* es muy similar al comportamiento del biofilm subgingival. (Sanchez, Llama-Palacios et al. 2011)

La superficie sobre la que se desarrolla un *biofilm* tiene una importante influencia en varios aspectos de las bacterias implicadas. Entre los cuales, se incluyen el ratio de unión de las bacterias a la superficie, la influencia en el fenotipo de las mismas, o la modificación en la expresión y producción de factores de virulencia y de exopolisacáridos.(Bhola, Su et al. 2011)

De esta forma, los estudios de interacción entre bacterias en *biofilm* y superficies en sistemas *in vitro* permiten hacer comparaciones entre diferentes materiales usando no solo las mismas condiciones de temperatura y medio ambiente, sino también usando la misma suspensión bacteriana.(Bhola, Su et al. 2011)

Una hipótesis para la prevención de las enfermedades peri-implantarias es la inhibición de la formación del biofilm mediante la neutralización de la

adhesión a la superficie de lo implante por los microorganismos.(Cabal, Malpartida et al. 2011, Moya, Cabal et al. 2012)

Los modificantes de superficies pueden función por modificación en la hidrofobicidad, por alteraciones en la composición química que no posibiliten la adhesión bacteriana o por implementación de dispositivos de liberación prolongada de fármacos antimicrobianos. Dentro de estos fármacos pueden-se incluirse por ejemplo la clorhexidina o vancomicina o minociclina. Entre los sistemas inorgánicos de recubrimiento se han reportado recubrimientos de nano partículas de plata y cobre. (Moya, Esteban-Tejeda et al. 2011)

Los biovidrios cargados con nano partículas vítreas sódio-cálcio capaces de desestabilizar la membrana celular son otra opción. En el caso de los biovidrios, cuando las partículas de vidrio interaccionan con la membrana de la bacteria, se produce una despolarización de dicha membrana lo que conduce a su total eliminación. Esta estudiado que la forma como esta interaccione ocurre esta fuertemente relacionada de la forma como los iones Ca están incorporados en la estructura del material de la superficie De especial interese es el factor de que estos materiales son de toxicidad reducida ya que los productos de la reacción de la superficie con la bacteria son CaO, SiO₂, Na₂O o que parece mejor que los biocidas inorgánicos con liberación de partículas de plata o cobre. (Cabal, Malpartida et al. 2011, Moya, Esteban-Tejeda et al. 2011, Moya, Cabal et al. 2012)

2. Objetivos e Hipótesis

El propósito de este estudio ha sido de observar el efecto biocida de un recubrimiento de Ecovidrio G3 en un disco compuesto cerámico-cerámico de nanocomposite Z10Ce sobre un modelo de biofilm *in vitro*. Este modelo de biofilm utilizado ha sido descrito por Sánchez et al 2011, y está compuesto de seis bacterias de la microbiota subgingival. Ha sido puesto a punto en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. (Sanchez, Llama-Palacios et al. 2011)

2.1 Objetivos Específicos

- Exponer el disco de Nanocomposite recubierto con Ecovidrio G3 al modelo específico de biofilm subgingival descrito por Sánchez et al. 2011 (Sanchez, Llama-Palacios et al. 2011), durante diferentes tiempos de incubación (24h, 48h y 82h).
- Comparar y comprobar la presencia y viabilidad bacteriana, entre el material en estudio y su control (la hidroxiapatita) en cada tiempo de incubación.

2.2 Hipótesis:

- El material en estudio produce un efecto biocida *in vitro* sobre el modelo de biofilm específico de seis bacterias.

3. Material y Métodos

3.1 Materiales utilizados en el estudio

Los materiales utilizados en el desarrollo del estudio fueron dos:

- Material control: Disco de Hidroxiapatita con 7mm de diámetro y 1.8mm de espesor (Clarkson Chromatography Products; Williamsport, PA, USA)
- Material experimental: disco de material compuesto cerámico-cerámico nanocomposite Z10Ce recubierto con Ecovidrio G3 biocida (A1) de 7mm de diámetro y 1.8mm de espesor. Estos fueron elaborados en el Centro de Investigación en Nanomateriales y Nanotecnología (CINN), el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de Oviedo (UNIOVI).

El disco control está recubierto completamente por hidroxiapatita y el disco con el material A1 está constituido por una superficie pulida y sin vidrio biocida y otra tratada, en la que se realizará el experimento.

Se utilizaran en el experimento tres discos de material A1 y tres discos de material control.

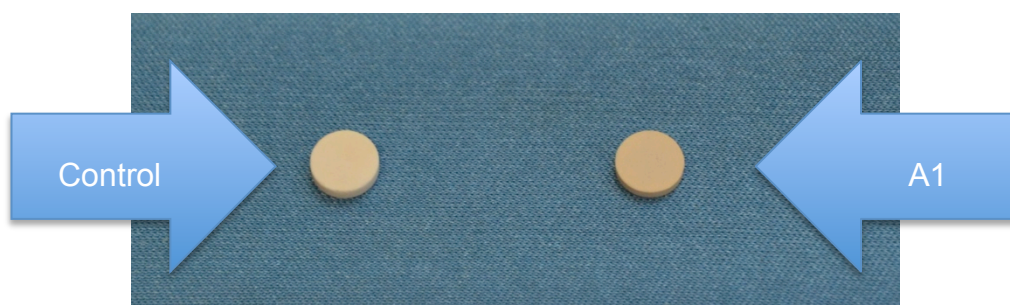


Figura 4 - Discos de los materiales utilizados en el experimento: El control y el material A1

3.2 Bacterias y medios de cultivo empleados

Para el desarrollo de esta investigación, se ha utilizado el modelo de biofilm in vitro descrito por Sánchez et al en 2011, siendo este validado como un modelo de biofilm subgingival. Para eso, se utilizaron bacterias que representan a los colonizadores primarios, secundarios y tardíos. (Sanchez, Llama-Palacios et al. 2011)

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio están representadas en la tabla 1.

Estas cepas bacterianas están conservadas a -80°C.

Tabla 1 - Cepas bacterianas utilizadas en el estudio

Cepa	Referencia
<i>Streptococcus oralis</i>	CECT ⁴ 907T
<i>Veillonella parvula</i>	NCTC ² 11810
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCC ³ 19039
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	DSMZ ¹ 20482
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	DSMZ ¹ 8324
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC ³ 33277

¹DMS, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

²NCTC, National Collection of Type Cultures

³ATCC, American Type Cultures Collection

⁴CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

Las bacterias se cultivaron en medio sólido en placas de medio Agar Sangre y de medio Dentaïd-1. El Agar Sangre (Oxoid no 2; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) se pone a esterilizar en autoclave a 121° C, luego se atempera a 45° C a baño maría y posteriormente se suplementa con un 5% de sangre de caballo, Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L). El medio Dentaïd-1 (Fumarato Sódico 1,5 g, formato sódico 1g, extracto de levadura 5 g, BHI agar, 52 g), también se pone a esterilizar en autoclave a 121° C y luego se tempera a 45° C a baño maría y posteriormente se añade vancomicina (1.8 ml) esterilizada por filtración.

También se cultivaron en medio líquido en medio de cultivo BHI modificado. Este medio consiste en medio BHI (Brain Heart Infusion, Becton, Dickinson and Company; EE.UU.) suplementado con mucina (2.5g/l), extracto de levadura (1.9 g/l), cisteína (0.1 g/l), hemina (5 mg/l), menadiona (1 mg/l) y un 0.25% de ácido glutámico (v/v)

3.3 Elaboración del inóculo con las seis cepas bacterianas seleccionadas y formación del biofilm en las superficies de los discos

Las bacterias se sembraron en medio sólido Agar Sangre a partir de “criobolas” mantenidas a -80°C , en condiciones de anaerobiosis (10% de H_2 , 10% de CO_2 y N_2 en equilibrio) a 37°C hasta que haya formación de colonias.

Posteriormente se renovó el cultivo tomando una colonia formada mediante una asa estéril y sembrando esa colonia en una nueva placa de agar sangre suplementado.

Una vez que se formaron las colonias en la nueva placa de Agar Sangre suplementado, se cultivaron las bacterias en medio líquido de cultivo BHI modificado (preinóculos). Para ello, se recogió una colonia de cada una de las especies, y se introdujeron en distintos tubos Falcon de 50 mL que contenían 10 mL de BHI modificado. De esta forma, tendríamos seis tubos, cada uno con un tipo de bacteria, y un tubo que contiene sólo BHI modificado como control negativo. Se incubaron en condiciones de anaerobiosis a una temperatura de 37°C , hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento en cada uno de ellos, la cual se comprueba mediante la medida espectrofotométrica a 550 nm.

Con el fin de estandarizar las condiciones del estudio y inocular una concentración constante de cada una de las cepas en todos los ensayos, favoreciendo así la reproducibilidad del modelo, se han utilizado las curvas de crecimiento de cada bacteria descritas por Sánchez et al (2011). (Sanchez,

Llama-Palacios et al. 2011). Éstas permiten relacionar con facilidad los datos de densidad óptica (D.O.) obtenidos por utilización de un espectrofotómetro, tiempo de generación y unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (UFC/mL).

Tabla 2 - Concentraciones bacterianas ideales a tener en el inoculo final

Cepas	Concentración final (ufc/mL)
<i>Streptococcus oralis</i>	10^3
<i>Veillonella parvula</i>	10^5
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10^5
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	10^6
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	10^6
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10^6

Para desarrollar el modelo de biofilm *in vitro* se procedió de siguiente manera:

se preparó un tubo Falcon de 50 mL con un inóculo de 10 mL que contenía las seis especies bacterianas seleccionadas (6 mL de las especies bacterianas y 4 mL de medio BHI modificado), al valor de UFC/mL anteriormente descrito en la tabla 2, y que se mantenía constante en todos los ensayos a fin de favorecer la reproducibilidad del modelo. Se ajustó la densidad óptica por dilución en el medio BHI modificado fresco hasta los valores estipulados en el estudio. Estos valores vienen determinados por el tiempo de generación de cada bacteria, corroborado en las curvas de crecimiento. Se agitó y se añadieron 1.5 mL de este inóculo a una placa de cultivo celular de 24 pocillos estéril (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania) en la que previamente, se han depositado los discos correspondientes a cada material con una pinza estéril, y se ha añadido

medio BHI modificado sin bacterias como control negativo. Al finalizar el proceso, la placa se incubó en condiciones de anaerobiosis a una temperatura de 37° C durante el periodo de estudio que variará entre 24, 48 y 72 horas.

3.4 Extracción del biofilm de los discos y recuento bacteriano por cultivo

Pasado el tiempo de incubación (24h, 48h o 72h), se sacó de la placa de cultivo celular, en condiciones de esterilidad, cada disco depositándolo en un tubo *Eppendorf* con 1ml de buffer estéril PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Posteriormente se agitó por vortex durante dos minutos con el fin de separar el biofilm del disco y disgregarlo. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 100 µL, que se diluyeron de forma seriada en buffer PBS estéril (*Phosphate Buffered Saline*) y se sembraron en placas de Agar Sangre suplementado y de Dentaïd-1, siempre por duplicado, por el método de siembra en superficie. Las placas inoculadas se incubaron en anaerobiosis a 37°C. Después de 7-10 días de incubación, se realizaron los recuentos de las UFC por placa de cada especie bacteriana, para determinar el número total de UFC/mL.

3.5 Visualización del biofilm mediante Microscopia Laser Confocal (CLSM)

El análisis mediante Microscopia Laser Confocal ha posibilitado la obtención de una imagen tridimensional del biofilm desarrollado y el estudio de la viabilidad bacteriana sobre la superficie del material en estudio y de la hidroxiapatita, durante las 24h, 48h y 72h de incubación.

Este análisis se llevó a cabo en el Centro de Asistencia a la Investigación - Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

Para estudiar la viabilidad del biofilm, éste se tiñó con el Kit *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.)*, que posibilita diferenciar las bacterias viables de no viables. Esta tinción, funciona con una combinación de fluorocromos, el “SYTO9 *green-fluorescent nucleic acid stain*” y el “Ioduro de Propidio *red-fluorescent nucleic acid stain*”.

Estos dos fluorocromos tienen características distintas en lo respecta a espectros de emisión y de capacidad de penetración en membranas celulares.

Estos dos fluorocromos mediante la excitación por el mismo Laser, emiten fluorescencia en longitudes de onda distintas. En el SYTO9, su máxima excitación se da cuando expuesto a radiación con longitud de onda de 480nm y en el Ioduro de Propidio es 490nm. Cuando excitados, el SYTO9 emite en los 500nm (verde) y el Ioduro de Propidio en los 635nm (rojo).

A nivel de la capacidad de penetración en membranas celulares, el SYTO9 es capaz de penetrar en todas las bacterias presentes en la muestra a diferencia del Ioduro de Propidio que solo consigue penetrar en las membranas dañadas (bacterias no viables).

Para la observación general del biofilm se utilizó un objetivo de 10x que permite una visión global del biofilm desarrollado y de su estructura.

3.6 Análisis Estadístico

Para el análisis estadística se utilizaron dos tipos de análisis distintos. Por un lado se realizó una análisis de la variancia (ANOVA) y por otro una comparación de medias (t de student). En las dos análisis se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov para cada variable y los datos se expresaron como media y desviación estándar utilizándose *Box-plots* para la representación grafica de los datos.

Para analizar el comportamiento de cada especie en ambas superficies durante el tiempo, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA): se evaluó si hubo cambios significativos en el crecimiento bacteriano entre las diferentes visitas, para cada especie bacteriana y material, mediante análisis de la varianza (ANOVA).

El análisis de comparación de medias (t de Student), se utilizó para comparar el crecimiento bacteriano, en UFC/mL, transformado en logaritmo para obtener una distribución normal, de cada microorganismo sobre ambas superficies (HA y material experimental A1) y para cada tiempo de incubación (24, 48 y 72 horas). Se utilizaron tres discos de cada material (n=3).

La análisis de comparación de medias se utilizó para la comparación de las concentraciones de cada bacterias en el material en estudio (A1) y el control (HA).

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

El programa estadístico utilizado ha sido el STATGRAPHICS Plus 5.1 para Windows XP (Statistical Graphics Corp.).

4. Resultados

4.1 Descripción de las imágenes obtenidas por CLSM

La formación del biofilm se estudió mediante Microscopia Laser Confocal (CLSM) en cada uno de los discos del material en estudio (A1) y del control (HA) en los tres tiempos de incubación (24h, 48h y 72h).

El biofilm presente en los discos, presenta una estructura tridimensional debido al acúmulo de bacterias y exopolisacáridos (glycocalix). Con esta técnica ha sido posible analizar tanto el espesor del biofilm como la viabilidad bacteriana de las bacterias presentes en el mismo.

Mediante el uso del Kit *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit*, ha sido posible analizar la viabilidad de las bacterias presentes en el biofilm. Observándose las células viva en verde (SYTO9) y las muertas en roja (Ioduro de Propidio).

4.1.1 Tiempo de estudio 24h

En el estudio a 24h, en el material control (HA), se pudo observar que la mayoría de las bacterias se disponen en pequeñas colonias o como bacterias aisladas. Se pudo ver también el inicio de formación de una torre o seta.

En la superficie del disco del material A1, se observó una tonalidad roja. Esto se debió, probablemente, a la existencia de una afinidad del Ioduro de Propidio por la superficie del material A1. En este material se visualizaron colonias aisladas así como una pequeña torre.

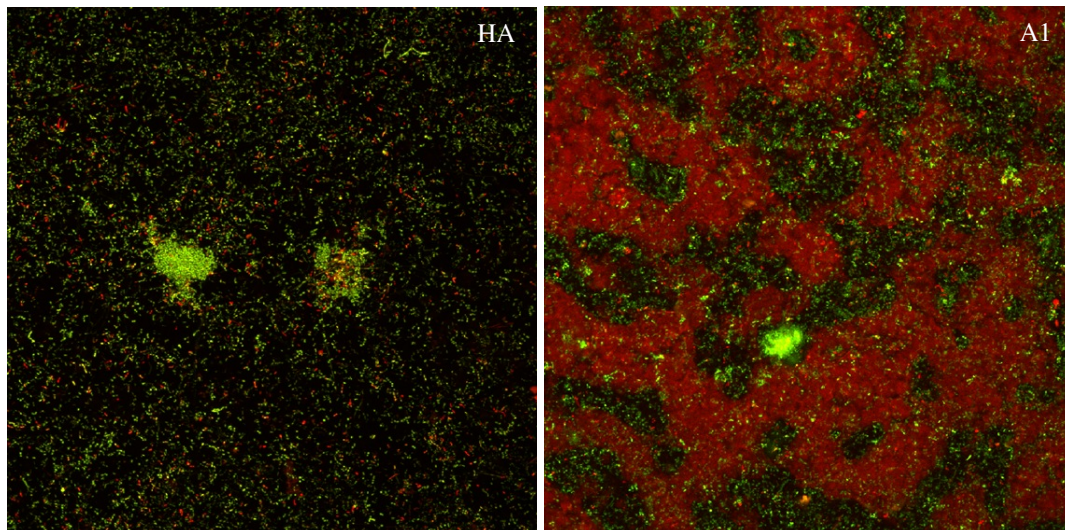


Figura 5 - Imagen obtenida por Microscopia Laser Confocal (CLSM) que es representativa del biofilm a las 24h

4.1.2 Tiempo de estudio 48h

En el tiempo de incubación del biofilm de 48h se pudo observar en el control que las bacterias se agrupaban mayoritariamente en una torre. Había también presencia de pequeñas colonias cuya mortalidad era mayor que la de las bacterias organizadas en la torre.

En el material A1, se observaban pequeñas colonias al nivel central de la figura con un aspecto menos viable que en el control. No había presencia de ninguna torre.

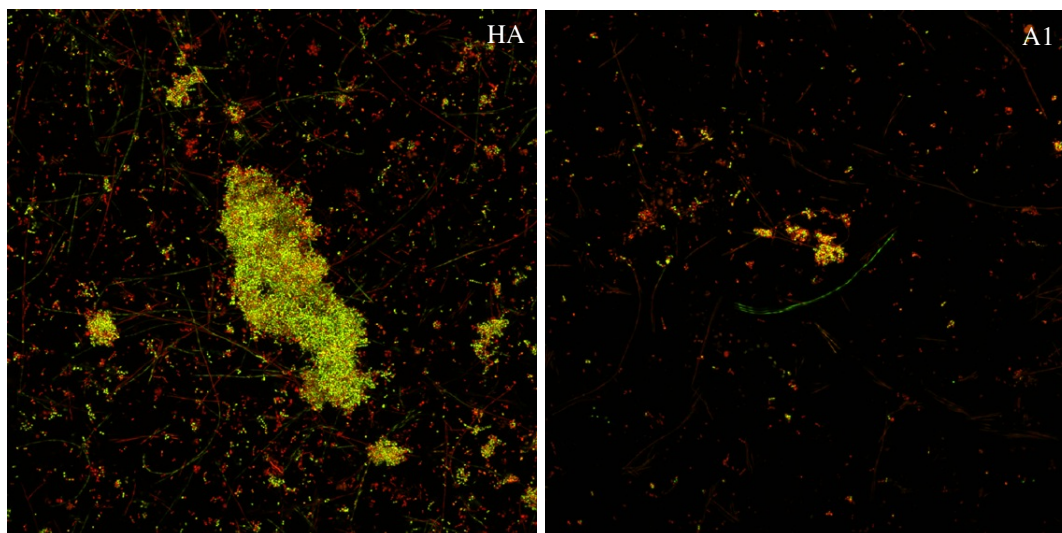


Figura 6 - Imagen obtenida por Microscopia Laser Confocal (CLSM) que es representativa del biofilm a las 48h

4.1.3 Tiempo de estudio 72h

En el tiempo de estudio de 72h, fue posible observar en el material control el desarrollo de una torre de dimensiones mayores que las presentes en el biofilm a 48h.

En el disco del material A1 existían pequeñas colonias todavía vivas pero la mayoría se encontraban no viables.

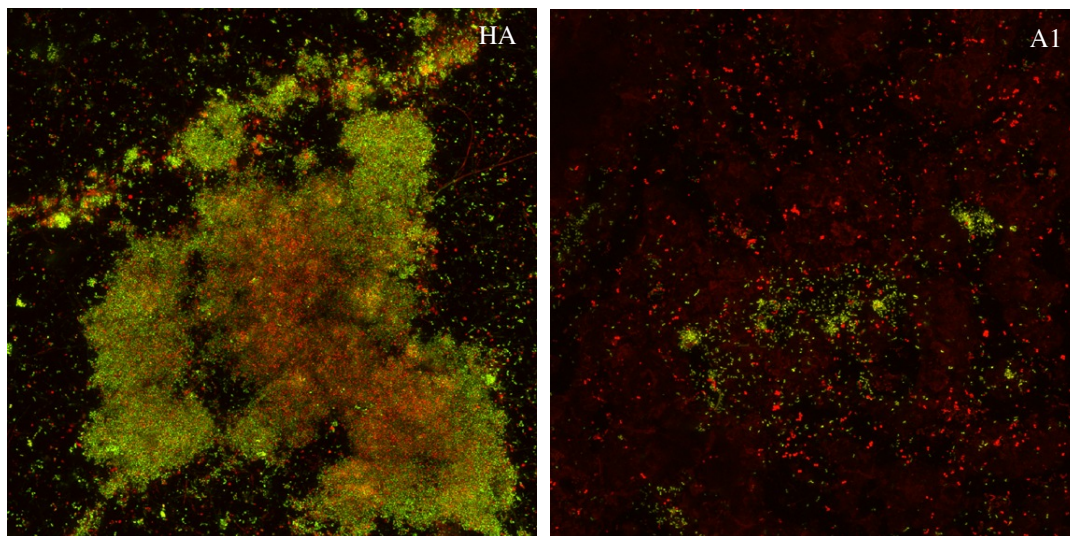


Figura 7 - Imagen obtenida por Microscopia Laser Confocal (CLSM) que es representativa del biofilm a las 72h

En ninguno de los tiempos de incubación se ha observado en el material A1 la presencia de la estructura típica de biofilm, que son torres.

4.2 Análisis cuantitativo de las bacterias viables mediante recuento por cultivo

Para cuantificar y validar la viabilidad de los organismos presentes en los biofilms desarrollados en las superficies del material A1 y del material control, se realizaron recuentos en las placas de medio Agar Sangre suplementado y Dentaïd-1, y se identificaron las bacterias presentes en cada uno de los biofilms recogidos.

Los datos de los recuentos fueron después organizados y estudiados de dos formas:

1. Evolución del valor UCM/mL de cada una de las cepas bacterianas seleccionadas en los tres tiempos en estudio (24h, 48h y 72h) para cada material;
2. Comparación del valor medio UFC/ml de cada bacteria en cada material a los distintos tiempos de incubación.

Para poder interpretar los datos, en el primer punto se ha utilizado un análisis de variancia y para el segundo una comparación de medias.

Los valores fueron considerados estadísticamente significativos siempre que $p < 0,05$.

4.2.1 Tiempo de estudio 24h

En el experimento a 24h, en el material A1, *A. actinomycetemcomitans* se incorporó menos al biofilm, el valor de p indica que no era estadísticamente significativo ($p=0,06$).

V. parvula estaba menos presente en el material A1, pero la diferencia no era estadísticamente significativa ($p=0,96$)

F. nucleatum a su vez se incorporó significativamente menos en el material A1, con un valor de p que muestra que es estadísticamente significativo ($p=0,03$)

Con respecto a *A. naeslundii* y *P. Gingivalis*, no se pudo hacer análisis estadístico debido a que, al menos dos discos de uno de los material no presentó crecimiento bacteriano. En este caso en particular, *A. naeslundii* y

P. Gingivalis fueron identificados apenas en uno de los discos de Ha, no siendo encontrados en ninguno de los discos del material A1.

S. oralis se incorporó en el material A1 menos que en HA pero la diferencia no era estadísticamente significativa ($p=0,59$).

Tabla 3 - Comparación entre material A1 y HA - experimento a 24h

Bacteria	Media±DE HA	Media±DE A1	p Valor
<i>S. oralis</i>	8,49±0,17	8,40±0,19	0,59
<i>V. parvula</i>	5,30±4,40	5,10±4,46	0,96
<i>A. naeslundii</i>	s/d	s/d	s/d
<i>F. nucleatum</i>	7,37±0,03	6,71±0,37	*0,03
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	7,40±0,10	6,98±0,26	0,06
<i>P. gingivalis</i>	s/d	s/d	s/d

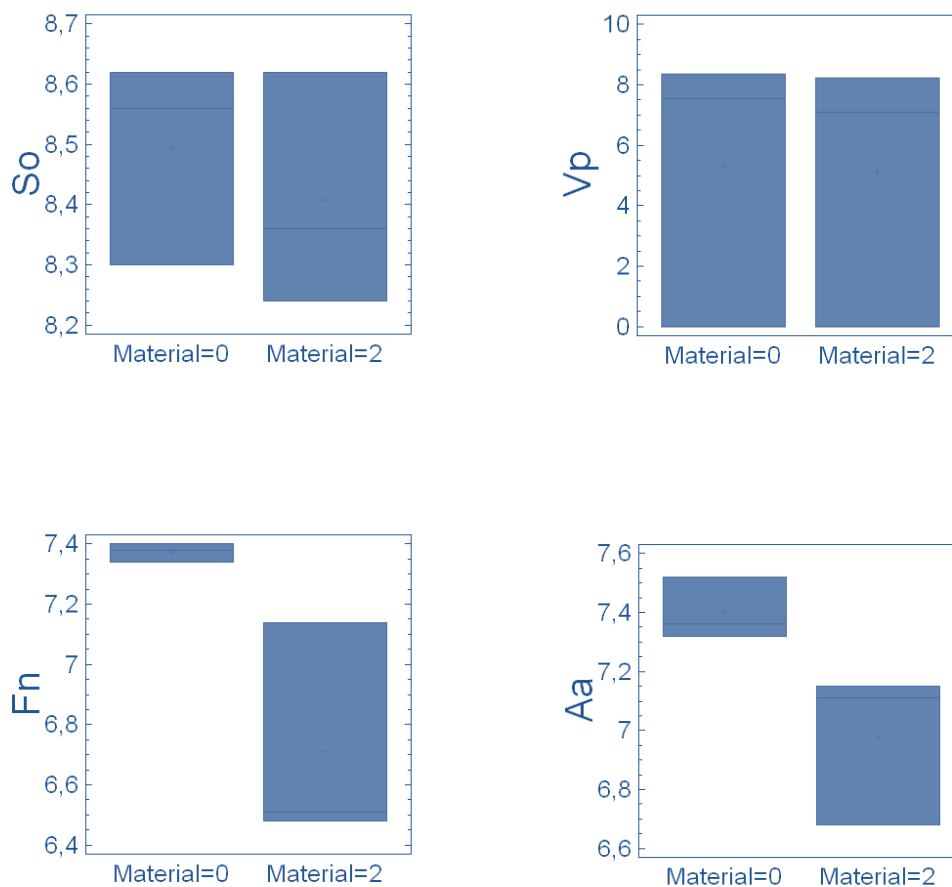


Figura 8 - Representación gráfica en *BOX-PLOT* . Comparación entre el material A1 y HA – experimento a 24h

4.2.2 Tiempo de estudio 48h

En el material A1, *A. actinomycetemcomitans* se incorporó menos que en la HA siendo la diferencia significativamente estadística ($p=0.01$)

S. oralis, *V. parvula* y *F. nucleatum* se incorporaron menos en A1 que en HA, pero la diferencia no era estadísticamente significativa, siendo el valor de p respectivamente, $p=0,20$; $p=0,54$ y $p=0,41$.

A. naeslundii se incorporó mas en el material A1 que en HA en el experimento a 48h también la diferencia no era estadísticamente significativa (p=0,74)

Con respecto a *P. gingivalis* no se pudo hacer análisis estadístico debido a que, al menos dos discos de uno de los materiales no presentó crecimiento bacteriano. En este caso en particular, *P. Gingivalis* fue identificado en dos discos de hidroxiapatita y en ninguno del material A1.

Tabla 4 – Comparación entre material A1 y HA – experimento a 48

Bacteria	Media±DE HA	Media±DE A1	p Valor
<i>S. oralis</i>	6,36±0,35	4,35±3,77	0,41
<i>V. parvula</i>	7,48±0,43	2,99±5,18	0,2
<i>A. naeslundii</i>	3,66±3,21	4,71±4,07	0,74
<i>F. nucleatum</i>	4,30±3,75	2,23±3,86	0,54
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	7,50±0,22	6,10±0,52	*0,01
<i>P. gingivalis</i>	s/d	s/d	s/d

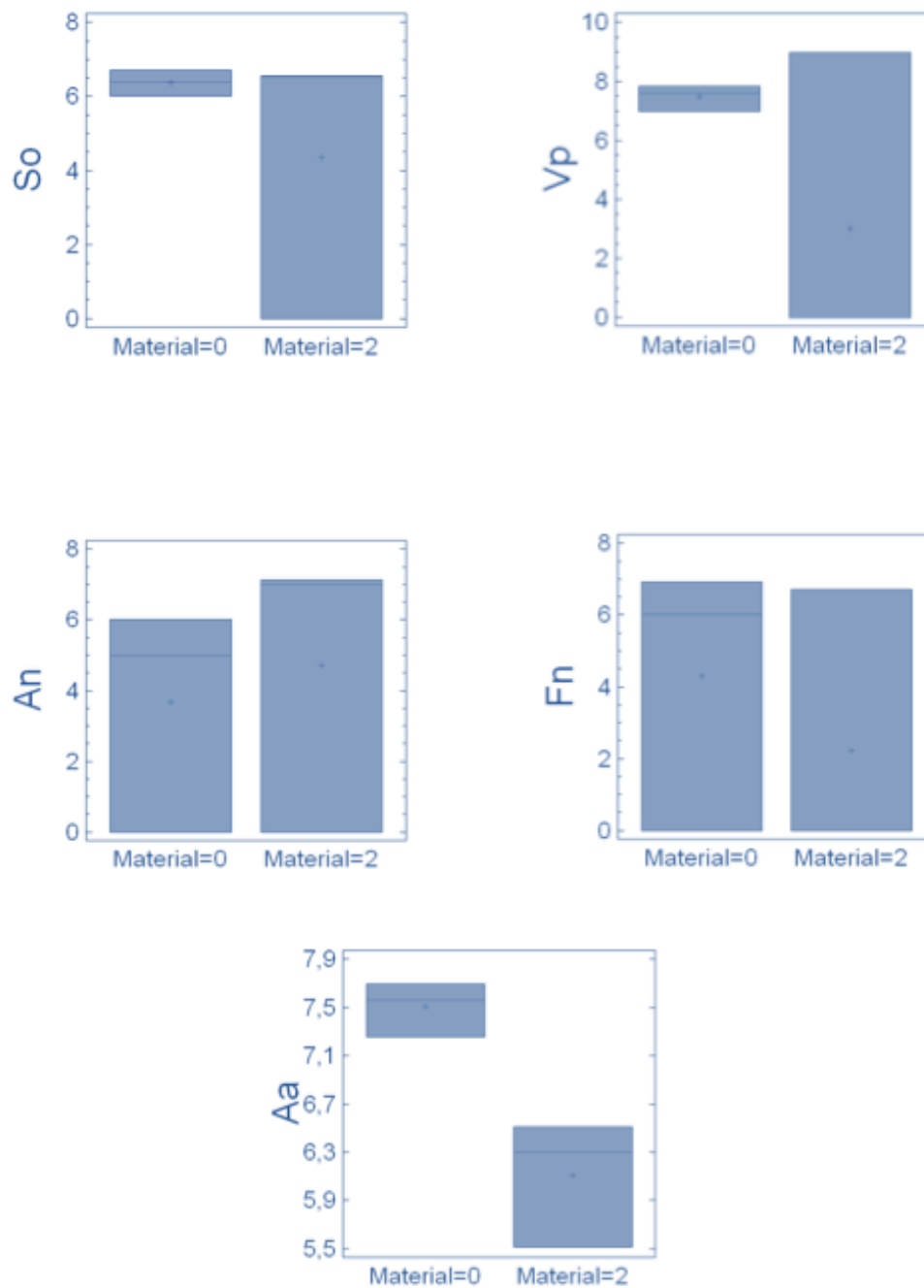


Figura 9 - Representación gráfica en *BOX-PLOT*. Comparación entre el material A1 y HA – experimento a 48h

4.2.3 Tiempo de estudio 72h

A. actinomycetemcomitans, *P. gingivalis*, *A. naeslundii* y *V. parvula* se incorporaron menos en el material A1 que en HA, pero las diferencias no eran estadísticamente significativas, siendo el valor de p respectivamente p=0,62; 0,24; 0,91 y 0,45.

S. oralis y *F. nucleatum* se unieron menos en el material A1 que en HA no siendo todavía las diferencias estadísticamente significativas siendo el valor de p respectivamente p=0,83 y p=0,51.

Tabla 5 - Comparación entre material A1 y HA - experimento a 48h

Bacteria	Media±DE HA	Media±DE A1	p Valor
<i>S. oralis</i>	4,16±3,61	4,86±4,21	0,83
<i>V. parvula</i>	6,77±0,90	4,74±4,12	0,45
<i>A. naeslundii</i>	4,53±4,01	4,18±3,36	0,91
<i>F. nucleatum</i>	4,41±3,82	5,97±0,11	0,51
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	6,56±0,50	6,31±0,60	0,62
<i>P. gingivalis</i>	5,73±0,77	5,1±0,17	0,24

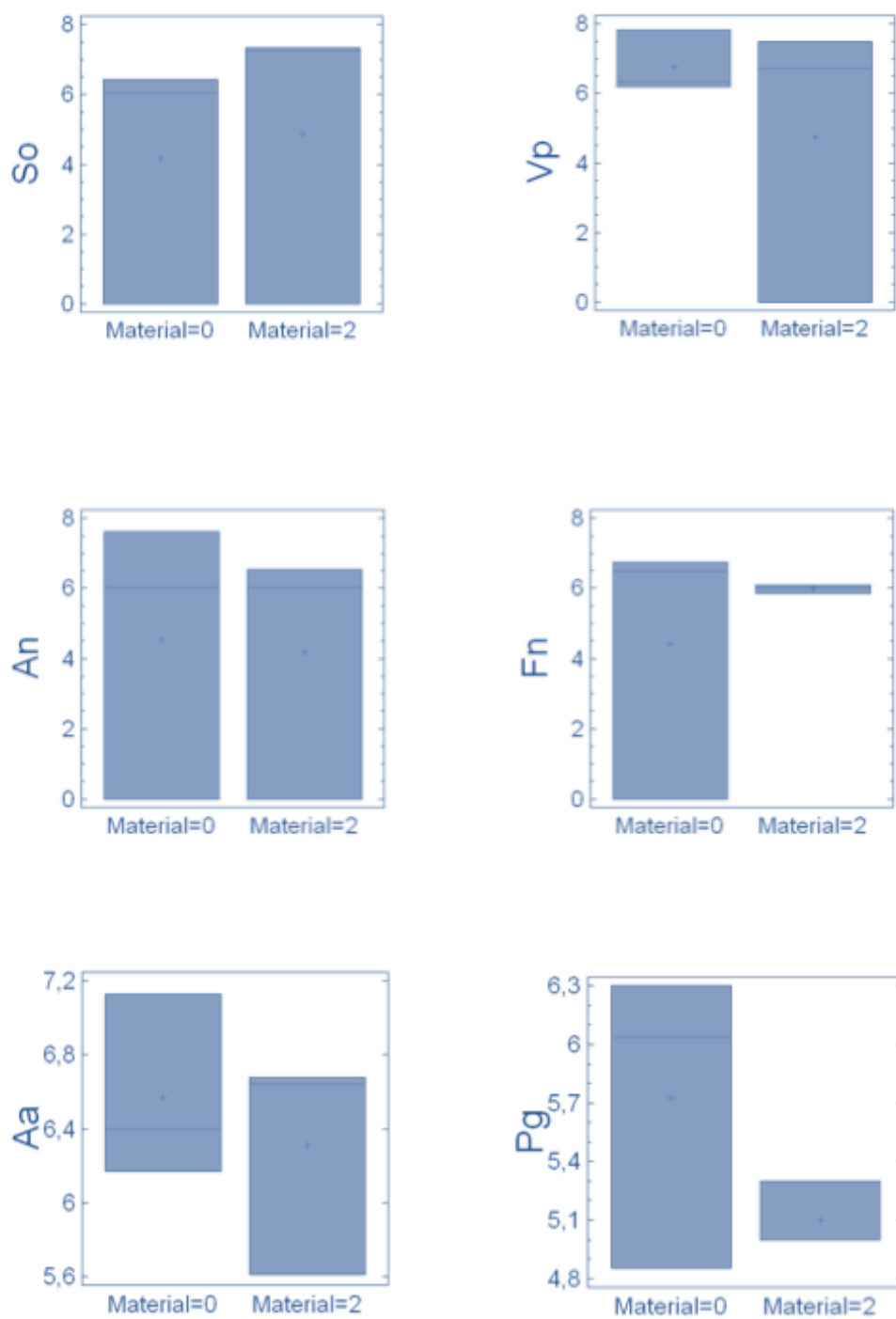


Figura 10 - Representación gráfica en *BOX-PLOT*. Comparación entre el material A1 y HA – experimento a 72h

4.2.4 Análisis de la evolución bacteriana en cada material de estudio

Al nivel de la evolución en el tiempo del biofilm se observaron diferencias estadísticamente significativas en *P. gingivalis* ($p=0$). Este dato es debido a que esta bacteria solo había sido identificada en el experimento a 72h, tanto en el material A1 como HA. Las otras bacterias presentaban un ritmo de desarrollo sin diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6 - Resumen estadístico de la evolución y maduración del biofilm en los tres tiempos en estudio en ambos los materiales

Bacteria	Media 24h	DE 24h	Media 48h	DE 48h	Media 72h	DE 72h	Valor p
So	8,4	0,19	4,35	3,77	4,86	4,21	0,32
Vp	5,1	4,46	2,99	5,18	4,74	4,12	0,83
An	0	0	4,71	4,07	4,18	3,63	0,21
Fn	6,71	0,37	2,23	3,86	5,97	0,11	0,1
Aa	6,98	0,26	6,1	0,52	6,31	0,6	0,32
Pg	0	0	0	0	5,1	0,17	0

Tabla 7 - ANOVA - Evolución bacteriana en el tiempo en ambos los materiales

<i>S. oralis</i>				<i>V. parvula</i>			
Contraste	Diferencias	Límites	p Valor	Contraste	Diferencias	Límites	p Valor
1-2	4,05	2,77	0,32	1-2	2,1133	9,2118	0,8397
1-3	3,54	2,77		1-3	0,3666	9,2118	
2-3	-5,1	2,77		2-3	-1,7466	9,2118	

<i>A. naeslundii</i>				<i>F. nucleatum</i>			
Contraste	Diferencias	Límites	p Valor	Contraste	Diferencias	Límites	p Valor
1-2	-4,71	6,29	0,21	1-2	4,47	4,48	0,1014
1-3	-3,18	6,29		1-3	0,73	4,48	
2-3	0,52	6,29		2-3	-3,74	4,48	

<i>A. actinomycetemcomitans</i>				<i>P. gingivalis</i>			
Contraste	Diferencias	Límites	p Valor	Contraste	Diferencias	Límites	p Valor
1-2	0,87	0,97	0,15	1-2	0	0,19	0
1-3	0,67	0,97		1-3	*-5,1	0,19	
2-3	-0,2	0,97		2-3	*-5,1	0,19	

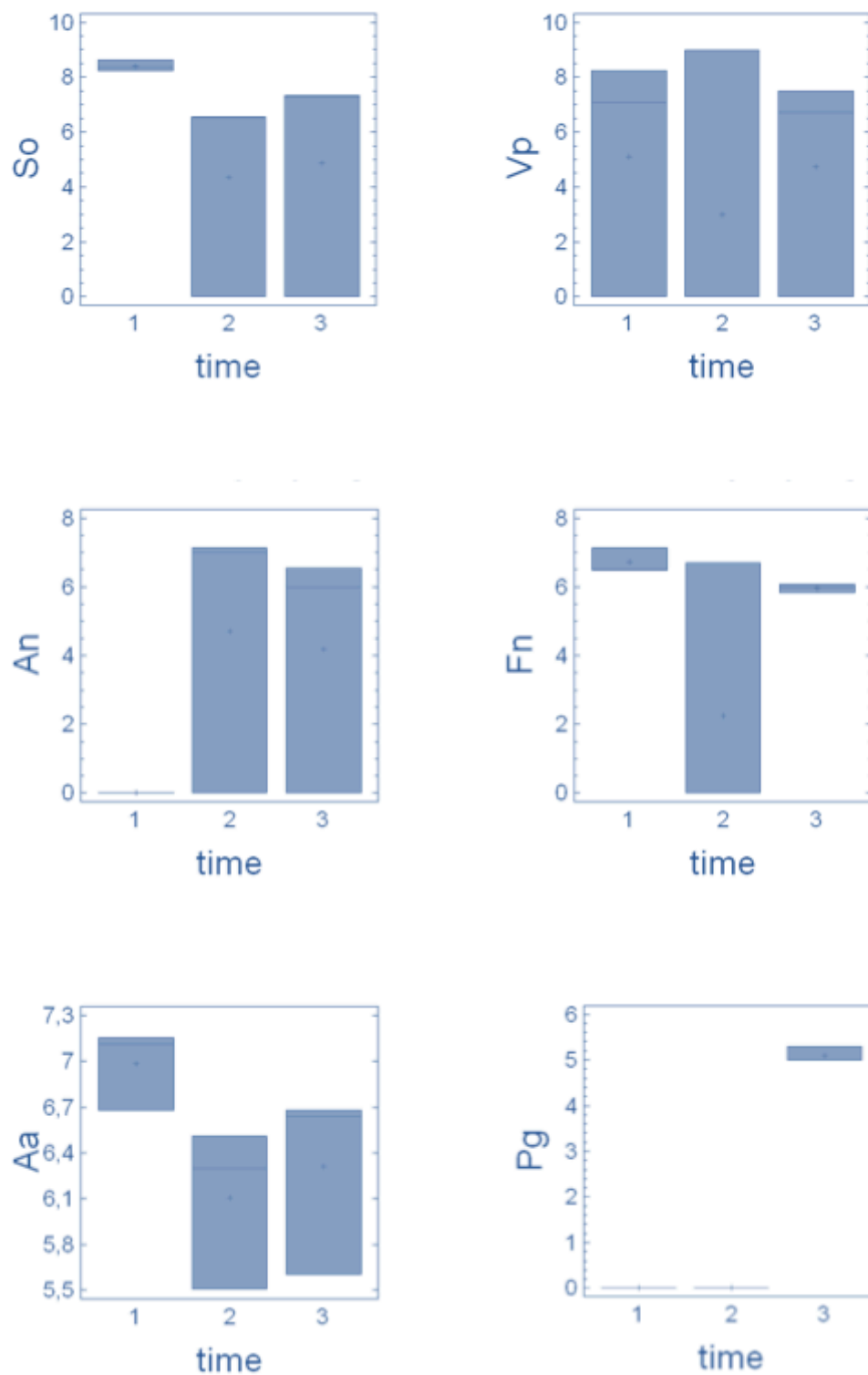


Figura 11 - Representación gráfica en *BOX-PLOT*. Comparación de la evolución bacteriana en el tiempo

5. Discusión

Actualmente, la rehabilitación de pacientes con implantes dentales es una práctica ampliamente difundida. Estos aparatos protésicos son susceptibles a la colonización por biofilms bacterianos, dado que están expuestos al medio oral. Estos dispositivos han ampliado mucho las posibilidades de tratamiento en pacientes total o parcialmente edéntulos, pero la mucositis y periimplantitis hace años que persiguen esta opción de tratamiento.

La prevalencia de las enfermedades periimplantarias es similar a la de las enfermedades periodontales. (Lindhe, Meyle et al. 2008, Zitzmann and Berglundh 2008), así que cada vez más se están buscando formas de prevenir estas enfermedades.

Se han comercializado distintos tipos de implantes pero las diferencias entre éstos son principalmente en características macro y micro-estructurales como el tipo de superficie y algunas propiedades físico químicas. Estas diferencias de superficie han sido principalmente con el objetivo de promover la osteointegración. (Taborelli, Jobin et al. 1997)

Las características de la superficie como la rugosidad, composición, hidrofobicidad y material de construcción son capaces de condicionar la colonización bacteriana.(Wennerberg and Albrektsson 2010).

S. oralis, según estudios *in vitro* e *in vivo*, es uno de los primeros colonizadores más comúnmente detectados en la superficie del diente.

(Wecke, Kersten et al. 2000, Sanchez, Llama-Palacios et al. 2011). Los colonizadores primarios alteran la superficie no sólo por su presencia física sino que también es probable que representen un nuevo fenotipo "adherido a la superficie" con distintas propiedades metabólicas, modificando así su entorno y la creación de nuevos nichos para la colonización de otras bacterias. (Davey and Costerton 2006). De esta forma, sería interesante el desarrollo de nuevos materiales con capacidades de impedir la unión de los colonizadores a la superficie. Cabal *et al*, publicaron el efecto biocida de vidrios *soda-lime* con partículas de plata sobre la bacteria *S. oralis*. (Cabal, Cafini et al. 2012)

Moya *et al* describieron en 2011 y 2012 procesos de tratamiento de superficies para la liberación progresiva de iones calcio, para uso en sistemas médicos de forma que se inhibiese la formación de biofilms en torno a éstos. (Moya, Esteban-Tejeda et al. 2011, Moya, Cabal et al. 2012). Este es el principio en el que se basa el mecanismo de acción biocida del material experimental A1.

Mediante Microscopia Laser Confocal ha sido posible observar que el material A1 parece interferir en la formación y desarrollo del biofilm, en comparación con la hidroxiapatita (material control), analizándose este fenotipo en los tres tiempos de incubación. Las imágenes presentes en los resultados evidencian grandes diferencias del comportamiento bacteriano en torno de la superficie de los dos materiales en los tres tiempos en estudio (24h, 48h y 72h).

En los experimentos de recuento bacteriano por cultivo a las 24h, analizando los datos de comparación de medias entre concentración de cada bacteria en cada uno de los dos materiales, se pudo comprobar que en el material A1, el colonizador secundario que actúa como puente para los colonizadores tardíos, *F. nucleatum*, se encuentra disminuido con significancia estadística ($p=0,03$). También encontramos que la concentración del periodontopatógeno *A. actinomycetemcomitans* se encuentra reducida ($p=0,06$). En este tiempo de incubación, en general, todas las bacterias se encuentran en menor cantidad en el material A1 a excepción de *A. naeslundii* y *P. gingivalis* que no fueron identificados.

En el tiempo en estudio de 48h se puede también observar algunas diferencias entre los dos materiales. Es posible constatar que el colonizador temprano *A. naeslundii* se encuentra en mayor concentración en el material A1, no teniendo, sin embargo, significación estadística ($p=0,74$). El periodontopatógeno *A. actinomycetemcomitans* se encuentra en el material A1 en menor cantidad siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,01$). Las restantes bacterias, a excepción de *P. gingivalis* que no ha sido identificada, han crecido menos en el material A1, pero sin significancia estadística.

En el tiempo de estudio de 72h, todas las bacterias han sido identificadas en el cultivo bacteriano. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *A. naeslundii* y *V. parvula* se incorporaron menos en el material A1 que en HA, pero las diferencias no son estadísticamente significativas. S.

oralis y *F. nucleatum* se incorporaron más en el material A1 que en HA, no siendo todavía las diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la evolución de cada especie bacteriana en el biofilm a lo largo de los tres tiempos de estudio, el periodonto patógeno *P. gingivalis* mostró un crecimiento nulo en tiempos cortos de incubación (24h y 48h) pero fue identificado en el biofilm a las 72h. Las restantes bacterias no presentaron ninguna diferencia con significación estadística.

Todos estos resultados son difíciles de comparar con otros estudios son sobre efectos biocidas frente a bacterias en estado planctónico o formando biofilm monoespecie (una solo especie bacteriana). En nuestro estudio estamos analizando el efecto biocida sobre un modelo de biofilm *in vitro* compuesto de seis bacterias.

Tras el análisis mediante Microscopia Laser Confocal se pudo constatar que no están presentes sobre la superficie del material A1, formaciones típicas de biofilm como torres. Nosotros postulamos que esto se debe a que el efecto biocida impidió la adhesión de los colonizadores iniciales y primarios, variando la cinética de incorporación de las bacterias al biofilm. Estos datos no están muy de acuerdo con los obtenidos por recuento bacteriano por cultivo. Esto se debe a que estos resultados son preliminares y se necesita aumentar el numero de discos por experimento y el numero de experimentos para poder confirmar estos estudios.

6. Conclusión

En este estudio, ha sido posible verificar el efecto biocida del revestimiento con Ecovidrio G3.

Esta línea de investigación es de gran interés ya que se están buscando nuevas formas de prevención y tratamiento de periimplantitis y nuevos materiales que favorezcan la osteointegración, y eviten la formación del biofilm sobre la superficie del implante. Aunque estos resultados son preliminares nos indican que este material compuesto cerámico-cerámico nanocomposite Z10Ce recubierto con vidrio biocida G3 es un buen candidato para una futura aplicación en la superficie de implantes.

Es recomendado aumentar el número de discos por experimento y el número de réplicas biológicas para poder confirmar estos estudios.

7. Agradecimientos

A Profesor Doctor Mariano Sanz, mi tutor, por toda su sobresaliente ayuda y disponibilidad, pero sobre todo por incentivar me y brindarme su confianza. Gracias por haber aceptado ser mi tutor. Me ha honrado muchísimo y es algo que nunca olvidaré.

A Profesor Doctor David Herrera por todo el apoyo con la estadística de este trabajo.

A Arancha por toda la ayuda y comprensión en tantas horas de trabajo en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio Giacomo y Nina, por toda la ayuda, comprensión y compañerismo. Aunque a veces hablara en *“Portuñol”*.

A mis padres, abuelos, hermano y Marta por todo el apoyo y comprensión en este año de ausencia.

Por último pero sin ser menos, quiero dar un especial agradecimiento a todo el personal del Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutensis de Madrid: María Sánchez, Ana O’connor, Itziar González y María Marín.

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad proyecto nº MATBIO2012-38645, estando este proyecto cofinanciado por el FEDER

8. Bibliografía

Albouy, J. P., I. Abrahamsson, L. G. Persson and T. Berglundh (2008). "Spontaneous progression of peri-implantitis at different types of implants. An experimental study in dogs. I: clinical and radiographic observations." Clin Oral Implants Res **19**(10): 997-1002.

Albrektsson, T. I., F. (1994). "Consensus report: implant therapy." Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology, Quintessence.

Berglundh, T., J. Lindhe, C. Marinello, I. Ericsson and B. Liljenberg (1992). "Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog." Clin Oral Implants Res **3**(1): 1-8.

Bhola, R., F. Y. Su and C. E. Krull (2011). "Functionalization of titanium based metallic biomaterials for implant applications (Retraction of vol 22, pg 1147, 2011)." Journal of Materials Science-Materials in Medicine **22**(12): 2833-2833.

Cabal, B., F. Cafini, L. Esteban-Tejeda, L. Alou, J. F. Bartolome, D. Sevillano, R. Lopez-Piriz, R. Torrecillas and J. S. Moya (2012). "Inhibitory Effect on In Vitro Streptococcus oralis Biofilm of a Soda-Lime Glass Containing Silver Nanoparticles Coating on Titanium Alloy." Plos One **7**(8).

Cabal, B., F. Malpartida, R. Torrecillas, A. Hoppe, A. R. Boccaccini and J. S. Moya (2011). "The Development of Bioactive Glass-Ceramic Substrates with Biocide Activity." Advanced Engineering Materials **13**(12): B462-B466.

Davey, M. E. and J. W. Costerton (2006). "Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates." Periodontol 2000 **42**: 13-26.

Kolenbrander, P. E., R. N. Andersen, D. S. Blehert, P. G. Egland, J. S. Foster and R. J. Palmer, Jr. (2002). "Communication among oral bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **66**(3): 486-505, table of contents.

Lang, N. P., T. Berglundh and P. Working Group 4 of Seventh European Workshop on (2011). "Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology." J Clin Periodontol **38 Suppl 11**: 178-181.

Lindhe, J., S. E. Hamp and H. Loe (1975). "Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study." J Periodontal Res **10**(5): 243-255.

Lindhe, J., J. Meyle and D. o. E. W. o. P. Group (2008). "Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology." J Clin Periodontol **35**(8 Suppl): 282-285.

Lindhe, J. and H. Rylander (1975). "Experimental gingivitis in young dogs." Scand J Dent Res **83**(6): 314-326.

Loe, H., E. Theilade and S. B. Jensen (1965). "Experimental Gingivitis in Man." J Periodontol **36**: 177-187.

Marsh, P. D. (2005). "Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style." J Clin Periodontol **32 Suppl 6**: 7-15.

Mombelli, A. and F. Decaillet (2011). "The characteristics of biofilms in peri-implant disease." J Clin Periodontol **38 Suppl 11**: 203-213.

Moya, J. S., B. Cabal, J. Sanz, A. C. da Silva, S. Mello-Castanho, R. Torrecillas and F. Rojo (2012). "Mechanism of calcium lixiviation in soda-lime glasses with a strong biocide activity." Materials Letters **70**: 113-115.

Moya, J. S., L. Esteban-Tejeda, C. Pecharroman, S. R. H. Mello-Castanho, A. C. da Silva and F. Malpartida (2011). "Glass Powders with a High Content of Calcium Oxide: A Step Towards a "Green" Universal Biocide." Advanced Engineering Materials **13**(6): B256-B260.

Pontoriero, R., S. Nyman, I. Ericsson and J. Lindhe (1992). "Guided tissue regeneration in surgically-produced furcation defects. An experimental study in the beagle dog." J Clin Periodontol **19**(3): 159-163.

Sanchez, M. C., A. Llama-Palacios, V. Blanc, R. Leon, D. Herrera and M. Sanz (2011). "Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota." J Periodontal Res **46**(2): 252-260.

Schwarz, F., N. Sahm, G. Iglhaut and J. Becker (2011). "Impact of the method of surface debridement and decontamination on the clinical outcome following combined surgical therapy of peri-implantitis: a randomized controlled clinical study." J Clin Periodontol **38**(3): 276-284.

Socransky, S. S. and A. D. Haffajee (2002). "Dental biofilms: difficult therapeutic targets." Periodontol 2000 **28**: 12-55.

Socransky, S. S., A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith and R. L. Kent, Jr. (1998). "Microbial complexes in subgingival plaque." J Clin Periodontol **25**(2): 134-144.

Taborelli, M., M. Jobin, P. Francois, P. Vaudaux, M. Tonetti, S. Szmukler-Moncler, J. P. Simpson and P. Descouts (1997). "Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (I) Surface characterization." Clin Oral Implants Res **8**(3): 208-216.

Theilade, E. and J. Theilade (1985). "Formation and ecology of plaque at different locations in the mouth." Scand J Dent Res **93**(2): 90-95.

Wecke, J., T. Kersten, K. Madela, A. Moter, U. B. Gobel, A. Friedmann and J. Bernimoulin (2000). "A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets." FEMS Microbiol Lett **191**(1): 95-101.

Wennerberg, A. and T. Albrektsson (2010). "On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions." Int J Oral Maxillofac Implants **25**(1): 63-74.

Zitzmann, N. U. and T. Berglundh (2008). "Definition and prevalence of peri-implant diseases." J Clin Periodontol **35**(8 Suppl): 286-291.